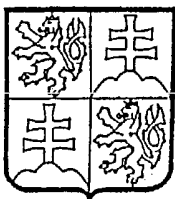


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu :

277 014

(21) Číslo přihlášky : 6740-88

(22) Přihlášeno : 11.10.88

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.³ :

G 01 N 33/53

G 01 N 33/68

(40) Zveřejněno : 15.04.92

(47) Uděleno : 30.09.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(73) Majitel patentu : Léčiva, s.p., Praha, CS;

Ústav sér a očkovacích látek, s.p., Praha, CS

(72) Původce vynálezu : Mach Otakar RNDr.CSc., Praha, CS;

Reiniš Milan RNDr., Praha, CS;

Hrubeš Miroslav, Praha, CS;

Vágner Josef ing., Praha, CS;

Vandasová Jana MUDr., Praha, CS;

Maňchal Petr RNDr.CSc., Praha, CS

(54) Název vynálezu : Roztok na potlačení nespecifických reakcí
při imunoanalýze

(57) Anotace :

Roztok je tvořen 0,05 až 0,1 M fosfátovým
puftrem o pH 7,0 až 7,2 a obsahuje 1 až
3 % hmot. hovězího sérového albuminu, 0,05
až 0,1 % hmot. neionogenního detergentu ty-
pu polyoxyethylensorbitanmonolaurátu, 1,8
až 18 % hmot. glukózy, 1 až 10 % hmot. gly-
cerolu a 0,005 % hmot. azidu sodného nebo
thimerosalu, přičemž zbytek tvoří fosfátový
pufr a vzájemný hmotnostní poměr hovězího
sérového albuminu a glycerolu činí 1 až
3 : 1 až 10.

Vynález se týká roztoku na potlačení nespecifických reakcí při provádění imunoanalýzy, což má velký význam v diagnostice některých infekčních onemocnění.

V současné době se provádí diagnostika infekčních onemocnění, zejména imunoenzymatickými testy, tzv. ELISA, při kterých se stanovuje přítomnost protilátek proti infekčnímu agens ve vyšetřovaném séru nebo naopak se stanovuje přítomnost infekčního agens ve vyšetřovaném materiálu. Na tomto principu je také založena diagnostika nyní nejzávažnějšího onemocnění syndromu získané imunitní nedostatečnosti - AIDS.

V klasické podobě se využívá tento test na průkaz protilátek proti viru HIV. ELISA destičky jsou pokryty antigenem, tj. buď inaktivovaným virem HIV, nebo peptidy připravenými buď genovou manipulací, a nebo zcela synteticky. Při provádění vlastního testu se do jamek ELISA destičky odměřuje určitý objem vhodně ředěného séra. K ředění se obvykle používá fosfátový pufr o pH = 7,0 obsahující 1 až 2 % hmot. hovězího sérového albuminu a 0,05 až 0,1 % hmot. neionogenního detergentu. Po inkubaci a promytí je do jamek odpipetován vhodně naředěný roztok konjugátu zvířecího protilidského gama globulinu s vhodným enzymem, obvykle s křenovou peroxidázou, a po inkubaci a promytí je barevná reakce získána inkubací s vhodným chromogenem.

K nespecifickým reakcím, které vedou ke zvýšení hodnot pozadí, a tím ke ztrátě rozlišení anebo k falešně pozitivním výsledkům u negativních sér, může docházet z nejrůznějších příčin - například nezablokováním povrchu jamky ELISA destičky. Proto se do ředícího roztoku na sérum přidává indiferentní bílkovina, obvykle hovězí sérový albumin nebo želatina. Tyto látky se vážou na volný povrch ELISA destičky, blokují ho a tím odstraňují, respektive potlačují nespecifity vlastní imunochemické reakce.

Nespecifická vazba může být ale zapříčiněna i jinými efekty, zejména hydrofobními interakcemi. Tento efekt je zvláště výrazný u ELISA souprav 3. generace, při kterých se používá k potahování ELISA destiček jako antigen syntetický oligopeptid.

Naproti ELISA destičkám, které využívají přirozenou bílkovinu jako materiál k potahování jamek ELISA destiček, je u ELISA souprav 2. generace, používajících rekombinantní polypeptid, a zejména u souprav ELISA 3. generace, které používají syntetické oligopeptidy, zvýšená plošná hustota potažení povrchu destičky antigenem. Vzhledem k tomu, že používané syntetické oligopeptidy představují sekvence o počtu obvykle 10 až 20 aminokyselin s preferencí určitých aminokyselin, vysoce se zvyšuje možnost hydrofobních interakcí s komponentami vyšetřovaného séra. Tato situace nenastává při použití přirozených bílkovin, protože tam většinou až na malé výjimky jsou všechny aminokyseliny v průměru stejně zastoupeny. Vysoká plošná hustota potažení destičky antigenem má za následek jednak zvýšení rychlosti vazby protilátky ve vyšetřovaném vzorku, což vede ke snížení inkubační doby, a tím zrychlení provedení vlastního vyšetření, ale i zvýšení pravděpodobnosti výskytu hydrofobních interakcí, které se potom výsledně jeví jako zvýšené pozadí, popřípadě ztráta rozlišení anebo nesoulad naměřených hodnot u vícekrát opakovaných rozborů vzorků.

Při současně používaném postupu a roztocích je tedy zejména u imunochemických souprav využívajících syntetické peptidy nebezpečí výskytu falešných výsledků vlivem hydrofobních interakcí.

Uvedené nevýhody odstraňuje roztok na potlačení nespecifických reakcí při imunoanalýze na bázi neutrálního fosfátového pufru, neionogenního detergentu a indifferenční bílkoviny podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že roztok tvořený 0,05 až 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0 až 7,2 obsahuje hmot. 1 až 3 % hovězího sérového albuminu, 0,05 až 0,1 % neionogenního detergentu typu polyoxyethylsorbitanmonolaurátu, 1,8 až 18 % glukózy, 1 až 10 % glycerolu a 0,005 % azidu sodného nebo thimerosalu, přičemž zbytek tvoří fosfátový pufr a vzájemný hmotnostní poměr hovězího sérového albuminu a glycerolu činí 1 až 3 : 1 až 10.

Roztokem podle vynálezu jsou tyto hydrofobní interakce potlačeny, aniž by došlo ke snížení citlivosti vlastní imunochemické reakce. K ředění vyšetřovaného vzorku se používají látky, potlačující hydrofobní interakce, ale neinterferující s provedením vyšetření.

Při vlastním provádění vyšetření ELISA testem se sérum ředí 1 : 10 až 1 : 100, obvykle 1 : 20. Při ředění 1 : 20 je inkubační doba 15 minut při 18 °C až 37 °C. Postup a ředící roztok je možné použít i při vyšetřování přítomnosti protilátek v séru imunizovaných zvířat, obvykle králíků. V tomto případě lze ředit na př. 1 : 100 až 1 : 10 000 při inkubační době 15 až 20 minut a teplotě 18 °C až 37 °C. Jako neionogenní detergent je možné použít s výhodou polyoxyalkylsorbitanů vyšších mastných kyselin.

Použití roztoku podle vynálezu na ředění vzorku je možné i u dalších imunochemických testů, jako jsou testy membránové nebo aglutinační, kde jím lze vhodně naředit vyšetřovaný biologický materiál. Dále jej lze použít i u imunochemických souprav nebo testů, využívajících přirozenou bílkovinu anebo bílkovinu získanou rekombinantní technologií.

Následující příklady provedení roztok podle vynálezu pouze dokládají, ale nikterak neomezuji.

Příklad 1.

ELISA destička byla potažena syntetickým peptidem, odvozeným z primární struktury viru HIV1. Jako pozitivní vzorek bylo použito sérum králíka, který byl tímto peptidem imunizován. Jako kontrolní sérum bylo použito sérum, odebrané králíkovi před imunizací. Imunizace byla prováděna podle čs. autorského osvědčení č. 272 395. Na jedné části destičky byla použita séra, ředěná běžně používaným ředícím roztokem, který je tvořen 0,9 % roztokem chloridu sodného, pufovaného fosfátovým pufrům 0,1 M na pH 7,0 až 7,2 a obsahujícím hmot. 3 % hovězího sérového albuminu a 0,1 % neionogenního detergentu polyoxyethylsorbitanmonolaurátu. Na druhé části destičky bylo sérum ředěno roztokem, který je předmětem vynálezu a ve kterém byl použit tentýž detergent. Inkubace byla prováděna 20 minut při 37 °C, následovalo 4x promytí, inkubace

s konjugátem prasečího protikráličího gama globulinu s křenovou peroxidázou ředěnou 1 : 5 000 po dobu 15 minut při 37 °C, opět 4x promytí, inkubace s chromogenem o-fenylendiaminem 5 min.. Po zastavení reakce 0,5 M kyselinou sírovou byla odečtena absorbance při 490nm na ELISA fotometru Dynatech a od ní odečtena hodnota slepého vzorku i pozadí měřením absorbance při 620nm. V tabulce 1. jsou zachyceny získané výsledky, získané měřením 11 králíčích sér. Je vidět, že došlo k potlačení nespecifické reaktivity.

Příklad 2

ELISA destička byla potažena syntetickým peptidem, který byl odvozen z povrchového glykoproteinu gp41 viru HIV1. Vyšetřovaná séra byla prokazatelně pozitivní na přítomnost protilátek proti viru HIV1 v ELISA testu Wellcome a ve Western blotu DuPont. Séra byla předředěna roztokem podle vynálezu mimo destičku v poměru 1 : 20 a byla pipetována vždy do 4 jamek, aby bylo možno prokázat reprodukovatelnost stanovení. Jako kontrolní séra byla použita kontrolní séra pozitivní a negativní z komerční soupravy Wellcome. Tato séra byla také předředěna 1 : 20 ředicím roztokem podle předmětu vynálezu, který obsahoval stejný detergent jako v příkladu 1. Inkubace probíhala 15 minut při teplotě laboratoře, tj. 18 °C až 20 °C, potom byla destička 4x promyta, následovala inkubace 15 min. při teplotě laboratoře s konjugátem prasečího protilidského gama globulinu s křenovou peroxidázou ředěnou 1 : 10 000. Potom následovalo 4x promytí a vyvolání barevné reakce s chromogenem tetramethylbenzidinem 5 minut. Po zastavení reakce 1N kyselinou sírovou byla odečtena absorbance při 450nm za stejných podmínek jako v příkladu 1. Výsledky jsou zachyceny na tabulce 2. Je vidět dobrá shoda mezi naměřenými hodnotami u čtveřice téhož vzorku a současně i dobrá citlivost.

Tabulka 1.

Závislost absorbance séra na ředícím roztoku

Sérum	A ₄₉₀ -	A ₄₉₀ +	Poznámka
Kontrolní č. 1	0,195 0,172 0,146 0,198	0,036 0,019 0,027 0,024	A ₄₉₀ -je hodnota absor- bance při 490 nm bez použití ředícího roztoku
Kontrolní č. 2	0,139 0,104 0,101 0,117	0,002 0,010 0,008 0,007	A ₄₉₀ +je hodnota absor- bance při 490 nm s použitím ředícího roztoku OVER značí hodnotu ab- sorbance větší než 2
Kontrolní č. 3	0,172 0,207 0,144	0,045 0,040 0,041	Sérum kontrolní-sérum králíka, odebrané před imunizací antigenem nebo sérum králíka, imunizovaného jiným antigenem.
Kontrolní č. 4	0,045 0,112 0,125	0,043 0,047 0,047	Pozitivní sérum-sérum králíka po imunizaci antigenem
Kontrolní č. 5	0,032 0,030	0,005 0,005	
Pozitivní č. 6	0,756 1,063 1,144 0,932	0,455 0,468 0,495 0,517	
Pozitivní č. 7	0,742 OVER OVER OVER	1,576 1,874 1,838 1,729	
Pozitivní č. 8	0,751 0,844 0,723	0,390 0,410 0,414	
Pozitivní č. 9	1,191 1,008 1,072 1,068	0,321 0,327 0,295 0,351	
Kontrolní č. 10	0,145 0,129 0,196	0,054 0,053 0,064	
Pozitivní č. 11	OVER OVER	1,219 1,362	

Tabulka 2.

Schéma destičky s výsledky testu ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Slepá	0.710	1.184	1.100	1.059	1.051	0.815	0.759	0.889	0.915	1.032	1.008
	K_p		29		34		30		31		32	
B	0.610	0.670	1.109	1.167	1.096	1.079	0.795	0.784	0.869	0.896	1.046	1.021
C	0.903	1.013	1.067	1.070	1.023	1.030	0.860	0.827	0.984	0.991	0.868	0.890
	33		35		36		38		37		34	
D	0.972	0.944	1.088	1.109	1.061	1.087	0.849	0.871	0.982	0.965	0.878	0.851
E	0.798	0.911	1.061	1.040	1.024	1.054	0.967	0.738	0.912	0.970	1.076	1.050
	40		41		42		43		44		45	
F	0.890	0.862	1.058	1.041	0.995	1.006	0.938	0.958	0.964	0.996	1.033	0.939
G	0.835	0.806	0.934	0.955	0.991	0.889	0.043	0.033	0.161	0.160	0.144	0.100
	46		47		48		N_1		N_2		K_n	
H	0.806	0.856	0.989	0.959	0.919	0.896	0.057	0.036	0.159	0.144	0.126	0.132

Destička ELISA č. 251, potažená syntetickým peptidem z glykoproteinu gp 41

Desetinná čísla udávají hodnotu absorbance při 450 nm

Pozitivní lidská séra značena 29 až 48

N_1 , N_2 - negativní lidská séra

K_p , K_n - sérum pozitivní a sérum negativní ze soupravy Wellcome

Příklad 3.

V tomto příkladě byl celý postup prováděn stejně, jako v příkladu 1, až na to, že inkubace probíhala při teplotě laboratoře 18 °C až 20 °C a jako detergent byl použit polyoxyethylensorbitanmonooleát. Dosažené výsledky byly shodné s výsledky, dosaženými podle postupu, jak je uveden v příkladu 1.

Příklad 4.

V tomto příkladě byl celý postup prováděn stejně jako v příkladu 2, až na to, že místo destiček ELISA byly použity proužky ELISA, které byly pokryty peptidy, odvozenými z jaderného proteinu p24 virů HIV1 a HIV2 a z obalového glykoproteinu viru HIV1 gp41.

Inkubace byla prováděna při 37 °C a jako chromogen byl použit o-fenylendiamin. Dosažené výsledky jsou uvedeny na tabulce 3.

Tabulka 3.

Schéma proužků a výsledky testu ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	0.00	0.02	0.19	0.18	0.13	0.14	0.14	0.17	N
B	1.71	1.67	1.62	1.62	1.73	1.59	1.26	1.18	K _p
C	0.47	0.45	0.51	0.57	0.49	0.47	0.58	0.52	1
D	0.70	0.61	0.70	0.70	0.56	0.59	0.65	0.58	2
E	0.37	0.40	0.31	0.32	0.34	0.29	0.40	0.51	3
F	0.30	0.40	0.32	0.30	0.30	0.33	0.35	0.32	4
G	0.77	0.76	0.78	0.68	0.71	0.73	0.78	0.71	5
H	0.56	0.54	0.51	0.52	0.52	0.50	0.50	0.59	6

Desetinná čísla udávají hodnotu absorbance při 490nm.

N- negativní lidské sérum

K_p- pozitivní kontrolní sérum ze soupravy Wellcome

Vyšetřovaná séra značena 1 až 6

Proužky 1,2 - peptid z bílkoviny p24 viru HIV1

Proužky 3,4 - peptid z bílkoviny p24 viru HIV2

Proužky 5,6 - peptid z bílkoviny gp41 viru HIV1

Proužky 7,8 - peptid z jiné oblasti bílkoviny gp41 viru HIV1

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Roztok na potlačení nespecifických reakcí při imunoanalýze na bázi neutrálního fosfátového pufru, neionogenního detergentu, indiferentní bílkoviny, glukózy a glycerolu, vyznačující se tím, že roztok tvořený 0,005 až 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7,0 až 7,2 obsahuje hmotnostně 1 až 3 % hovězího sérového albuminu, 0,05 až 0,1 % neionogenního detergentu typu polyoxyethylensorbitanmonolaurátu, 1,8 až 18 % glukózy, 1,8 až 18 % glukózy, 1 až 10 % glycerolu a 0,005 % azidu sodného nebo thimerosalu, při čemž zbytek tvoří fosfátový pufr a vzájemný hmotnostní poměr hovězího sérového albuminu a glycerolu činí 1 až 3 : 1 až 10.

Konec dokumentu
